2 月 February
2020，63(2)：131－141

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http：//www.insect.org.cn
doi：10.16380/j.kcxb.2020.02.002

灰飞虱中 IKK 相关基因的鉴定及其在水稻条纹病毒侵染中的功能

鲁燕华[1,2]，卢　刚[2]，亓玉华[2]，叶庄新[2]，李俊敏[2]，陈剑平[1,2,*]

（1. 浙江农林大学农业与食品科学学院，浙江临安 311300；2. 宁波大学植物病毒学研究所，浙江宁波 315211）

摘要：【目的】本研究旨在鉴定灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中的 IκB 激酶（IκB kinase，IKK）相关基因，并调查其在灰飞虱抗病毒中的作用，以进一步深入理解传毒介体应对植物病毒的先天免疫机制。【方法】通过生物信息学鉴定了灰飞虱基因组中 IKK 相关基因；以无毒及水稻条纹病毒（rice stripe virus，RSV）侵染的灰飞虱为材料，利用 RT-PCR 方法检测 IKK 相关基因在无毒灰飞虱各个龄期（卵、1－5 龄若虫、雄成虫和雌成虫）及成虫不同组织（肠道、唾液腺、血淋巴、脂肪体、卵巢和精巢）中的表达量；利用 qRT-PCR 方法检测无毒以及 RSV 侵染后的灰飞虱 IKK 相关基因在各个龄期及成虫不同组织中的表达量；通过对 3 龄若虫注射 IKK 基因 dsRNA 进行 RNA 干扰后，利用 qRT-PCR 检测带毒灰飞虱中表示病毒含量的 RSV 外壳蛋白（CP）基因转录水平。【结果】在灰飞虱基因组中鉴定到了两个 IKK 相关基因即 *IKKα*（GenBank 登录号：MK903504）和 TANK 结合激酶 1（TANK-binding kinase1）基因 *TBK*1（GenBank 登录号：MN124506）。*IKKα* 开放阅读框长 2 379 bp，编码 792 个氨基酸；*TBK*1 开放阅读框长 1 551 bp，编码 516 个氨基酸。两个基因编码的蛋白都具有 1 个保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域和 1 个泛素折叠结构域。RT-PCR 结果表明，*IKKα* 和 *TBK*1 在无毒灰飞虱各个龄期及成虫不同组织中均有表达。qRT-PCR 分析结果表明，*IKKα* 和 *TBK*1 在 RSV 侵染后的灰飞虱各个龄期及成虫不同组织中的表达水平与其在无毒灰飞虱中的表达量之间存在明显差异。进一步将 RSV 侵染后的灰飞虱 3 龄若虫中的 *IKKα* 和 *TBK*1 干扰后，带毒灰飞虱中的 RSV 含量显著上升。【结论】本研究结果表明，NF-κB 信号途径中的两个重要基因 *IKKα* 和 *TBK*1 在灰飞虱中广泛表达，且在灰飞虱抵御 RSV 的侵入过程中可能具有重要功能。这些结果为今后进一步深入研究 NF-κB 免疫通路在灰飞虱抗病毒中的功能提供了丰富的基础信息。

关键词：灰飞虱；IKK；水稻条纹病毒；NF-κB 信号途径；qRT-PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2020)02-0131-11

Identification of the IKK related genes and their antiviral roles in response to *Rice stripe virus* infection in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

LU Yan-Hua[1,2], LU Gang[2], QI Yu-Hua[2], YE Zhuang-Xin[2], LI Jun-Min[2], CHEN Jian-Ping[1,2,*]
(1. College of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin′an, Zhejiang 311300, China; 2. Institute of Plant Virology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract:【Aim】This study aims to identify the IκB kinase (IKK) related genes in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, and to investigate its antiviral role in this insect, so as to further

基金项目：国家重点研发计划项目(2016YFD0300706)；农业部/浙江省植保生物技术重点实验室开放课题
作者简介：鲁燕华，女，1994 年 9 月生，浙江绍兴人，硕士研究生，研究方向为灰飞虱抗病毒免疫机制，E-mail：yhl594594@163.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：jpchen2001@126.com
收稿日期 Received：2019-08-06；接受日期 Accepted：2019-10-31

understand the innate immune mechanisms in insect vectors responsive to plant viruses. 【Methods】The IKK related genes in the *L. striatellus* genome were identified and characterized using bioinformatics approach. The healthy and the rice stripe virus (RSV) infected planthopper were used as the materials. The expression levels of IKK related genes in various developmental stages (egg, 1 – 5 instar nymphs, male and female adults) and adult tissues (gut, salivary gland, hemolymph, fat body, ovary and testis) of the RSV-free planthoppers were detected by RT-PCR. The relative expression levels of IKK related genes in the above different developmental stages and adult tissues between the RSV-free and RSV-infected planthoppers were assayed by qRT-PCR. In addition, the transcription levels of coat protein (CP) gene indicating the accumulation levels of RSV were determined after RNAi by injection of the double-stranded RNA of IKK related genes in the 3rd instar nymph of RSV-infected planthoppers. 【Results】Two IKK related genes, *IKKα* (GenBank accession number: MK903504) and TANK-binding kinase 1 gene *TBK*1 (GenBank accession number: MN124506), were identified in the genome of *L. striatellus*. The open reading frame (ORF) of *IKKα* is 2 379 bp in length, encoding 792 amino acids, while the ORF of *TBK*1 is 1 551 bp in length, encoding 516 amino acids. The proteins coded by both genes have a conserved serine/threonine kinase domain and a ubiquitin folding domain. The RT-PCR results confirmed that *IKKα* and *TBK*1 were ubiquitously expressed in various developmental stages and different adult tissues of RSV-free *L. striatellus*. Significant expression differences of *IKKα* and *TBK*1 in various developmental stages and different adult tissues between the RSV-free and RSV-infected planthoppers were observed. The accumulation level of RSV was significantly increased after RNAi of *IKKα* and *TBK*1 in the 3rd instar nymphs of the RSV-infected planthoppers, respectively. 【Conclusion】The results indicate that *IKKα* and *TBK*1, the important genes of NF-κB signaling pathway, are widely expressed in *L. striatellus* and may play important roles in *L. striatellus* in response to RSV invasion. These results will contribute to the further investigation on antiviral immune pathway in insect vectors against plant virus.

Key words: *Laodelphax striatellus*; IKK; *Rice stripe virus*; NF-κB signaling pathway; qRT-PCR

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 属半翅目(Hemiptera)飞虱科(Delphacidae),是稻飞虱的一种,主要为害禾本科植物(蔡邦华等, 1964)。灰飞虱广泛分布于东亚、东南亚、欧洲、北非等地,中国各省均有发生,以长江中下游和华北稻区发生较多、危害最为严重。除直接取食汁液危害作物之外,灰飞虱还是多种植物病毒的传播媒介,如水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)和水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)等,严重影响我国粮食生产安全(浦茂华, 1963)。灰飞虱的生命周期分为卵、若虫、成虫 3 个阶段。在解剖镜下观察发现,灰飞虱的卵呈香蕉形,并且以卵块或单位卵的形式产在水稻植株下部的叶鞘内或叶片组织中,抽穗后产卵于穗颈部内,卵期约 7 ~ 11 d。灰飞虱产卵量大,每头雌成虫产卵可达 100 ~ 300 余粒,产卵期可持续数天。初产颜色为乳白色,后期淡黄色(王柳风等, 2013)。灰飞虱取食危害时分泌的"蜜露",富含多种糖类和氨基酸,覆盖在植株上,会引起真菌的滋生,导致稻穗发黑及霉变,严重影响水稻品质和产量(刘向东等, 2006)。近年来,灰飞虱传播的水稻病毒病逐年加重,加上农药滥用引起的灰飞虱抗药性问题愈发突出,因此研究灰飞虱体内抗病毒过程中的相关基因功能,可为防控水稻病毒病提供科学依据。

在动物抗病反应中,核转录因子(nuclear factor kappa B, NF-κB)和干扰素(interferon, IFN)控制重要的信号级联,介导了许多促炎细胞因子的转录表达,如炎细胞因子、粘附分子、生长因子及抗凋亡存活蛋白等(Mercurio *et al.*, 1997; Rothwarf *et al.*, 1998)。IκB 激酶(IKK)及相关激酶是这些抗病通路的调节因子(DiDonato *et al.*, 1997; Pham and Tenoever, 2010)。在未受外界刺激的正常细胞中,NF-κB 与其抑制因子 IκB 结合,细胞处于静息状态,被隔离在细胞质中。而当细胞受细胞因子或病原物刺激时,信号便通过细胞表面受体将信号转化到 IKK 复合物上,IKK 被激活导致 IκB 磷酸化并通过

泛素化酶识别使其降解(Karin and Ben, 2000),与其结合的 NF-κB 被释放出来,并从细胞质中易位至细胞核激活靶基因的表达,产生应激及免疫反应。IKK 复合物是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,一般认为由 IKKα, IKKβ 及 NEMO(IKKγ)3 个亚基组成。IKKα 和 IKKβ 具有较高的序列同源性和相似的结构,N 末端均含有蛋白激酶区,因此具有丝氨酸蛋白激酶活性,可催化底物 IκB 发生磷酸化(Rothwarf and Karin, 1999)。近几年,另外两种与 IKKα 和 IKKβ 序列相似的 IKK 相关激酶也已被鉴定出,即 IKKE(或称为 IKK-i)和 TBK1(TANK-binding kinase 1)[或称为 NF-κB activated kinase (NAK)或 TRAF2-associated kinase (T2K)](Tojima *et al.*, 2000)。IKKE 和 TBK1 在 NF-κB 信号通路活化过程中与经典的 IKK(IKKα 和 IKKβ)一样都具有磷酸化靶点的作用,因此多把 IKKE 和 TBK1 称为 NF-κB 的额外活化激酶,或者叫非经典 IKKs(Kim *et al.*, 2013)。两者均具有保守的蛋白结构域,都包含一个 N 端激酶区域,一个羧基端亮氨酸拉链结构和一个螺旋-环-螺旋结构及一个 C 末端的 NEMO 结合域(Nakatsu *et al.*, 2014)。TBK1 作为通路的重要分子,在机体抗病毒、抗菌免疫以及信号传导调控等方面均发挥着重要作用。敲除小鼠的 *TBK*1 基因,可导致小鼠的肝细胞凋亡,引起胚胎死亡(Bonnard *et al.*, 2000)。而在细胞水平 *TBK*1 的过表达能够引起经典的 IKKβ 以及 NF-κB 的激活(Kumar *et al.*, 2011)。

目前关于 IKK 基因的相关研究主要集中在哺乳动物及模式昆虫(如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*)中,而在灰飞虱等植物病毒传毒介体中还未见任何报道。本研究以灰飞虱为研究对象,从其基因组中筛选鉴定了灰飞虱的 *IKKα* 和 *TBK*1,明确了其在灰飞虱不同发育阶段及组织中的表达,并初步研究了其在 RSV 侵染过程中的功能,这些结果为进一步深入研究 NF-κB 免疫通路在植物病毒传毒介体中的功能提供了丰富信息。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　植物材料:所用的水稻品种为武育粳 3 号,将水稻种子置于塑料筐并用自来水冲洗数次后浸泡,放置于 30℃人工气候培养箱浸种 24 h;催芽 1 ~ 2 d,每天及时更换浸种用水。待种子发芽后播种于透明玻璃烧杯中,盖上透气纱网培养。

1.1.2　供试虫源:本研究中所使用的灰飞虱有两个种群,分别为无毒(RSV-free)及 RSV 侵染(RSV-infected)的灰飞虱,均为江苏省农业科学院周益军实验室惠赠。带毒灰飞虱种群的带毒率利用 RSV 外壳蛋白(coat protein, CP)进行检测,引物序列见表 1。实验室带毒灰飞虱种群经多代纯化筛选,带毒率稳定在 80% ~90%。同时每个月在无毒灰飞虱种群中随机抽取 50 头灰飞虱进行病毒检测,保证种群未受 RSV 污染。灰飞虱种群维持在常规粳稻(武育粳 3 号)上,于人工气候室饲养。灰飞虱种群的饲养条件为: 26 ±1℃,光周期 16L∶8D,相对湿度 75%。每隔 7 d 更换一次水稻苗。

1.1.3　试剂: DNA Marker, RNA Free H_2O 和 TAE 缓冲液等购自上海生工生物公司;琼脂糖购自翊圣生物公司;KOD FX Neo 高保真扩增酶购自 TOYOBO 公司;Trizol 试剂盒购于赛默飞生物公司;氯仿购于上海凌风化学试剂有限公司;cDNA 逆转录试剂盒购自天根生物公司;T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;qRT-PCR 试剂 ChamQ SYBR® qPCR Master Mix 购于诺唯赞生物公司;酒精等其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2　灰飞虱 IKK 相关基因的鉴定及生物信息学分析

利用其他昆虫的 IKK 相关基因,包括黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的 *IKKβ*(GenBank 登录号: NM_080012.4), *IKKγ* (GenBank 登录号: NM_001259574.2, NM_079132.4), *IKKE*(GenBank 登录号: NM_165337.2, NM_136204.3),白蚁 *Cryptotermes secundus* 的 *IKKα*(GenBank 登录号: XP_023711368.1)和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的 *TBK*1 (GenBank 登录号: XM_019046304.1)为诱饵序列,与新建立的灰飞虱基因组本地库(Zhu *et al.*, 2017)进行 Blast 同源比对(设置 e 值 $<10^{-5}$),鉴定并明确灰飞虱中 IKK 相关基因的核苷酸 ORF 序列及对应的氨基酸序列。进一步利用 NCBI 保守结构域数据库预测 IKK 相关基因 ORF 中的保守结构域;在 NCBI 中寻找相应基因的同源序列,利用 BioEdit 软件(版本: 7.0.9.0)进行同源序列比对;最后利用 MEGA 7.0 中邻接法(neighbor-joining method)构建系统发生树(bootstrap 值为 1 000 次)。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this study

目标基因 Target gene	引物序列(5′–3′) Primer sequence	引物用途 Purpose
RSV-CP	F: TGCCTCATCCTCGAAGAACTCC	基因扩增 Gene amplification
	R: AGCCAGCCACTCTAGCTGATTT	
IKKα	F: ATGAAGCCAGAAGAGATAACT	
	R: TTAAAATTCTTTCTCTGGATTCA	
*TBK*1	F: ATGTCTTTCCTTAGAGGCTC	
	R: TCACCAACTCTTTCGTAACAC	
18S rRNA	F: GTAACCCGCTGAACCTCC	
	R: GTCCGAAGACCTCACTAAATCA	
RSV-CP	F: TGCAGAAGGCAATCAATGACAT	qRT-PCR
	R: TGTCACCACCTTTGTCCTTCAA	
IKKα	F: ACAGAGTCCTTGGAGTGGGA	
	R: TCTGAGATCACCCAGAGAGCA	
*TBK*1	F: ACGATGCTACATTGGCGAAA	
	R: CCTCATAACGGCATCAACCA	
actin	F: GCCCATCTACGAAGGTTACG	
	R: CGTAGCTCTTCTCCAGTGAAC	
ds*GFP*	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGAACAAGTTCTCCGTTCCGGC	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
	R: TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGTTCCTTGATGCCGTTCT	
ds*IKKα*	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGAGCGCATCACACACC	
	R: TAATACGACTCACTATAGGGAGATCCATTCACAACCTCACCGC	
ds*TBK*1	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGAGCTATGTACAGGTGGGA	
	R: TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGGGACGGAATGGCAAGTT	

下划线部分为 T7 启动子序列。T7 promoter sequence is underlined.

1.3 灰飞虱样品收集、RNA 提取及 cDNA 合成

以无毒及 RSV 带毒灰飞虱为材料，收集卵、低龄若虫(1–3 龄)、高龄若虫(4–5 龄)、雄成虫和雌成虫不同发育阶段样本。其中,卵的收集是将处于产卵期的雌成虫转移至健康水稻苗上,2~3 d 后,将水稻取出转移至解剖镜下收集产在茎基部的虫卵。收集灰飞虱成虫肠道、唾液腺、卵巢(雌成虫)、血淋巴、脂肪体和精巢(雄成虫)等不同组织。不同发育阶段及组织的灰飞虱样品均设 3 个生物学重复,每个生物学重复取 10 头灰飞虱个体。

收集的新鲜样品立即放入液氮冷冻,按 Trizol 试剂盒说明提取样品总 RNA,并利用 RNA 电泳和蛋白核酸定量分析仪检测其质量。以上述提取的 RNA 为模板参照诺唯赞公司反转录试剂盒 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR 说明书,用两步法反转录获得 cDNA 第 1 链。

1.4 RT-PCR 检测 IKK 相关基因在无毒灰飞虱中的表达

根据 1.2 节得到的灰飞虱 IKK 相关基因的核苷酸序列设计引物,*IKKα* 和 *TBK*1 的引物序列见表 1。以灰飞虱的 18S rRNA(GenBank 登录号: JF773149.1)序列作为阳性对照,18S rRNA 的引物序列见表 1。以 ddH_2O 作为阴性对照(CK)。用 1.3 节合成的无毒灰飞虱 cDNA 第 1 链为模板进行 RT-PCR,明确 *IKKα* 和 *TBK*1 基因在灰飞虱不同发育阶段及各个组织中是否表达。PCR 反应体系(10 μL): 2×Hieff™ PCR Master Mix (with Dye) 5 μL,上下游引物(0.2 μmol/L)各 0.3 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH_2O 3.4 μL。反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。用 4 μL 的 2K Plus DNA Marker,取5~7 μL PCR 产物经 1%(m/v)的琼脂糖凝胶电泳检测。将含有目的条带大小的回收产物送往擎科(杭州)生物公司进行 DNA 测序,测序正确后于 –80℃保存或用于下一步 dsRNA 合成。

1.5 qRT-PCR 检测 IKK 相关基因在 RSV 带毒和无毒灰飞虱中的表达

设计 *IKKα* 和 *TBK*1 基因的定量 PCR 引物,*IKKα* 的引物序列见表 1,引物扩增效率为 98.3%。*TBK*1 的引物序列见表 1,引物扩增效率为 90.5%。以灰飞虱 *actin*(GenBank 登录号: AY192151.1)为内参基因,引物序列见表 1。以 1.3 节合成的无毒

和带毒灰飞虱不同发育阶段及成虫各个组织 cDNA 第 1 链为模板，使用SYBR® Green Real-time PCR Master Mix 进行 qRT-PCR。反应体系（10 μL）：上下游引物（0.2 μmol/L）各 0.3 μL，cDNA 模板 0.4 μL，ddH_2O 4.0 μL。反应条件：94℃ 4 min；94℃ 15 s，60℃ 15 s，72℃ 20 s，40 个循环，用溶解曲线来确定扩增片段的特异性。

1.6 RNAi 干扰 RSV 侵染后的灰飞虱中的 IKK 相关基因

通过 PCR 在目的基因序列两端添加 T7 启动子，ds*GFP* 作为对照基因，按照 T7 RiboMAX Express RNAi System（Promega，美国）试剂盒说明书合成 dsRNA；ds*GFP*，ds*IKKα* 和 ds*TBK*1 的引物序列见表 1。分别取 5～7 μL 合成后的 dsRNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，检测其条带大小。确认 dsRNA 完整度和大小无误后，使用紫外分光光度计测定 dsRNA 浓度和纯度待用。取龄期一致的 RSV 带毒灰飞虱 3 龄若虫，用 CO_2 麻醉后，选用显微注射仪对若虫第 2 和第 3 腹节之间进行注射（每头注射约 100 ng dsRNA），每次至少重复 20 头灰飞虱。将注射 dsRNA 的灰飞虱若虫置于 25℃ 室温饲养 4 d 后单头取样，按照 1.3 节方法提取 RNA，反转成 cDNA，－80℃保存用于后续 qRT-PCR。

1.7 qRT-PCR 检测 RSV 侵染后的灰飞虱中 IKK 相关基因的 RNAi 干扰效率及 RSV 病毒含量

取 1.6 节中 RNAi 处理 4 d 后的灰飞虱样品，利用 qRT-PCR 分别检测 *IKKα* 和 *TBK*1 的表达量以及带毒灰飞虱中 RSV 外壳蛋白的表达量变化，方法同 1.5 节。其中，*IKKα*，*TBK*1 和 *RSV-CP* 的 qRT-PCR 引物序列见表 1，*RSV-CP* 的引物扩增效率为 95.7%。

1.8 数据分析

实验数据使用 Excel 2007 和 GraphPad Prism 6 进行分析、处理和绘图，数据统计使用 Student 氏 *t* 检验方法进行分析，$P < 0.05$ 表示样本间存在显著差异，$P < 0.01$ 表示样本间存在极显著差异。

2 结果

2.1 灰飞虱 IKK 相关基因的克隆及序列分析

利用同源比对方法从灰飞虱基因组中鉴定和克隆了灰飞虱的两个 IKK 相关基因的 ORF，经 NCBI 蛋白数据库 BlastX 比对分析表明这两个基因为 *IKKα*（GenBank 登录号：MK903504）和 TANK 结合激酶 1（TANK-binding kinase 1）基因 *TBK*1（GenBank 登录号：MN124506）。NCBI 同源比对结果表明，与灰飞虱 *IKKα* 同源性最高的为褐飞虱 *Nilaparvata lugens IKKα*（GenBank 登录号：XP_022189635.1），氨基酸序列一致性为 92%；其次为堆砂白蚁 *Cryptotermes secundus IKKα*（GenBank 登录号：XP_023711368.1）和西花蓟马 *Frankliniella occidentalis IKKα*（GenBank 登录号：XP_026290137.1），氨基酸序列一致性分别为 38% 和 44%。与灰飞虱 *TBK*1 同源性最高的为褐飞虱 *TBK*1（GenBank 登录号：XP_022189807.1），氨基酸序列一致性为 97%；其次为烟粉虱 *Bemisia tabaci TBK*1（GenBank 登录号：XP_018901849.1）和茶翅蝽 *Halyomorpha halys TBK*1（GenBank 登录号：XP_014288800.1），氨基酸序列一致性分别为 75% 和 75%。*IKKα* ORF 全长 2 379 bp，编码 792 个氨基酸；*TBK*1 ORF 全长 1 551 bp，编码 516 个氨基酸（图 1）。保守结构域分析结果表明，和已报道的其他动物中的 IKK 结构类似，灰飞虱 IKKα 和 TBK1 均具有 1 个保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域和 1 个泛素折叠区域（图 1），这两个功能结构域对 NF-κB 免疫信号通路的活化过程中具有关键作用（赵运旺，2016）。

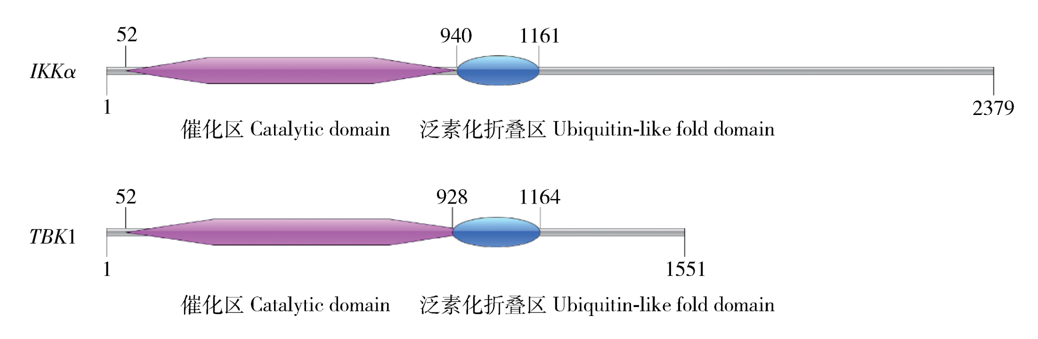


图 1　灰飞虱 *IKKα* 和 *TBK*1 基因 ORF 结构示意图

Fig. 1　Schematic diagram of the structures of *IKKa* and *TBK*1 ORFs in *Laodelphax striatellus*

2.2 灰飞虱 *IKKα* 和 *TBK*1 的系统进化分析

利用 NCBI 中的同源序列,对不同物种 IKKα 和 TBK1 的氨基酸序列进行多重序列比对分析,并进一步构建两个蛋白的系统发生树。系统进化分析表明,IKK 及其相关蛋白的系统进化树主要为两个大分支,第 1 个分支为 IKKα,第 2 个分支包括 IKKE 和 TBK1(图 2)。灰飞虱的 IKKα 和 TBK1 在系统分类树中有明确的分支定位,进一步明确了灰飞虱中这两个 IKK 相关基因的具体分类。灰飞虱的 IKKα 和西花蓟马、堆砂白蚁和湿木白蚁 *Zootermopsis nevadensis* 这 3 种昆虫的相应基因聚类较近,而灰飞虱 TBK1 则与茶翅蝽、烟粉虱、柑桔木虱 *Diaphorina citi* 具有较高的亲缘关系(图 2)。

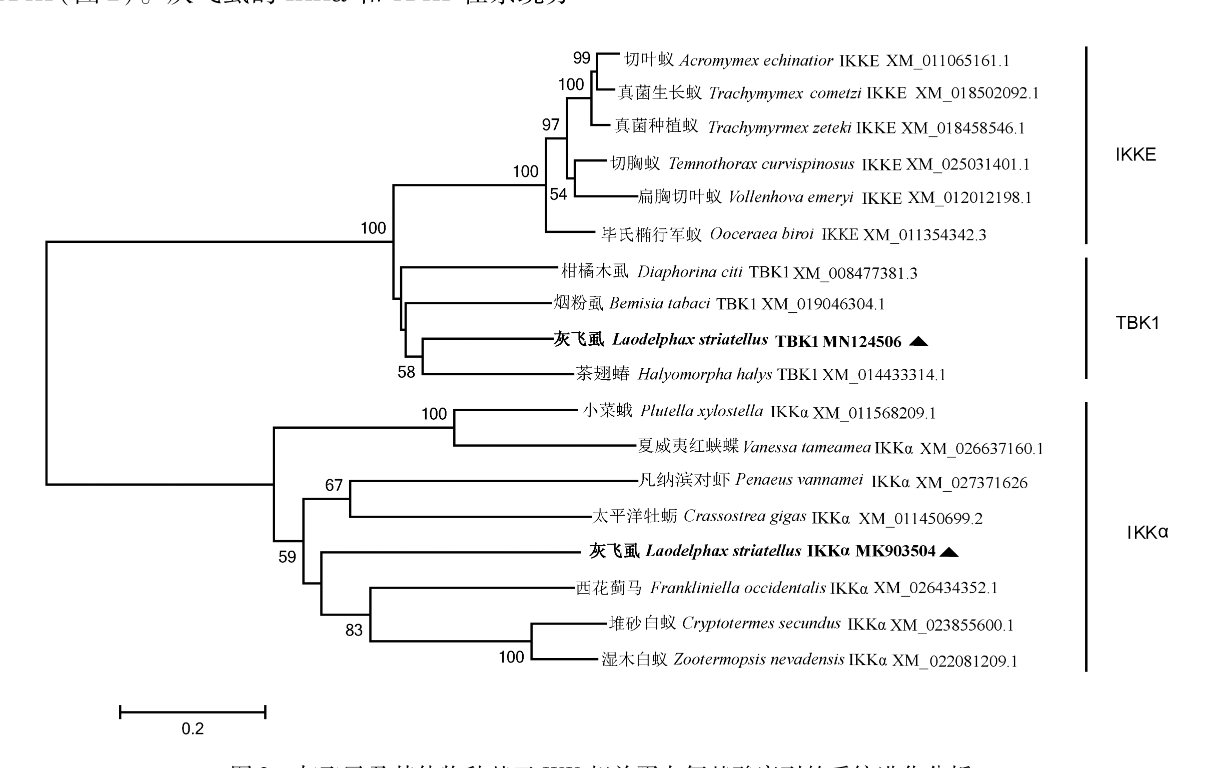


图 2 灰飞虱及其他物种基于 IKK 相关蛋白氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Laodelphax striatellus* and other species based on the amino acid sequences of the IKK related proteins

灰飞虱的 IKKα 和 TBK1 以三角符标记;分支上的数字表示 1 000 次重复抽样符合聚类的百分数;标尺表示每单位长度位点替代率。IKKα and TBK1 of *L. striatellus* are marked with a triangle symbol. The numbers on the branches represent the percentages of times that the species are grouped together in the bootstrap analysis for 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit of branch length.

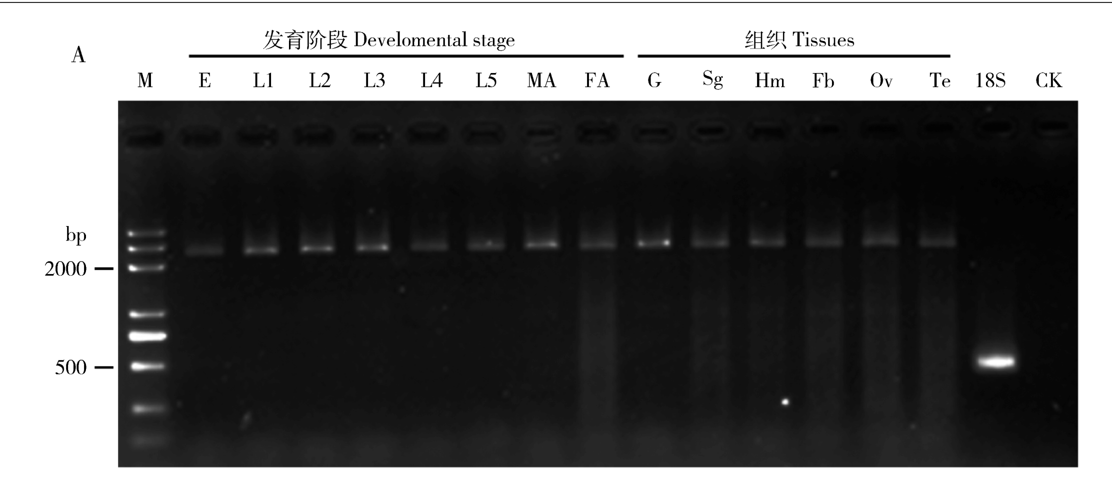
2.3 *IKKa* 和 *TBK*1 在无 RSV 的灰飞虱不同龄期、成虫不同组织中的表达

为全面了解 *IKKa* 和 *TBK*1 在灰飞虱中的表达,我们利用 RT-PCR 方法对这两个基因在无毒灰飞虱不同发育阶段(卵期、1-5 龄若虫、雄成虫和雌成虫)及成虫各个组织(肠道、唾液腺、血淋巴、脂肪体、卵巢和精巢)中的表达量进行了检测。检测结果如图 3 所示,在灰飞虱各个龄期及成虫组织中均能稳定扩增出 *IKKa* 和 *TBK*1,表明这两个基因在灰飞虱所有龄期及成虫组织中均广泛存在并持续表达。

2.4 RSV 侵染对 *IKKα* 和 *TBK*1 在灰飞虱不同龄期、成虫不同组织中转录水平的影响

qRT-PCR 结果表明,*IKKα* 在无毒灰飞虱各个龄期表达相对稳定,*TBK*1 在无 RSV 侵染的 2 龄若虫中的表达量最低。带毒虫中,随着发育龄期的增加,*IKKα* 的表达量不断升高(2 龄若虫除外),*IKKα* 和 *TBK*1 在不同龄期的表达峰值均出现在灰飞虱的雌成虫中(图 4)。RSV 侵染后,*IKKa* 在 1 龄、3-5 龄若虫及雌雄成虫中的表达量均较无毒虫的显著增加($P<0.05$)(图 4: A);而 *TBK*1 在病毒侵染后的 1-2 龄、4 龄若虫及雌雄成虫中表达量均较无毒虫的显著上调($P<0.05$)(图 4: B)。两个基因在带毒雌成虫中的表达量均比无毒虫中的上调 4 倍以上(图 4)。

对于成虫不同组织,无毒灰飞虱中 *IKKa* 在脂肪体和卵巢中高表达,带毒虫中除这两个组织外,*IKKa* 在唾液腺也具有很高的表达量。RSV 侵染后,*IKKa* 的表达量在带毒虫的唾液腺、血淋巴及精巢中相对于无毒虫的相应组织中均极显著上调($P<0.01$)



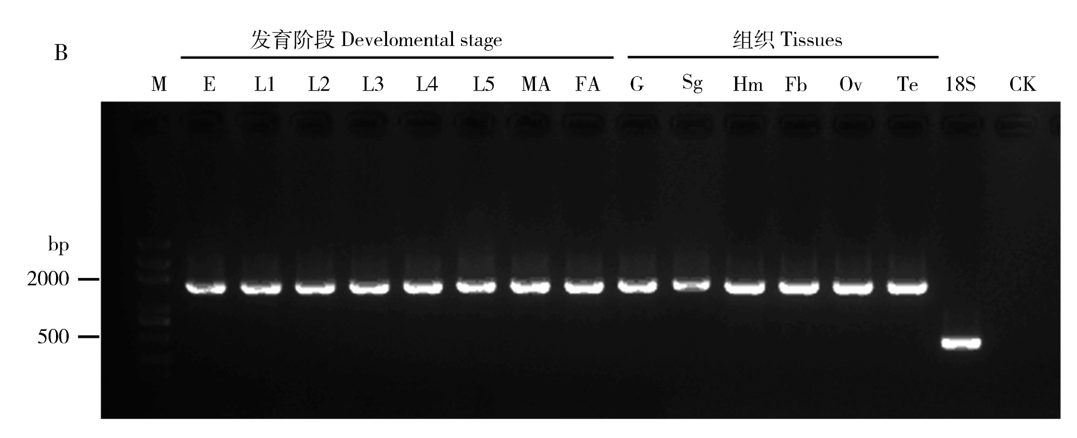


图 3　*IKKa* (A)和 *TBK*1(B)在灰飞虱不同龄期和成虫不同组织中的表达量

Fig. 3　Relative expression levels of *IKKa* (A) and *TBK*1 (B) in different developmental stages and adult tissues of *Laodelphax striatellus*

M: 2K Plus DNA Marker; E: 卵 Egg; L1 – 5: 分别为 1 – 5 龄若虫 1st – 5th instar nymph, respectively; MA: 雄成虫 Male adult; FA: 雌成虫 Female adult; G: 肠道 Gut; Sg: 唾液腺 Salivary gland; Hm: 血淋巴 Hemolympph; Fb: 脂肪体 Fat body; Ov: 卵巢 Ovary; Te: 精巢 Testis; 18S: 18S rRNA, 阳性对照 18S rRNA as the positive control; CK: 空白对照 Blank control.

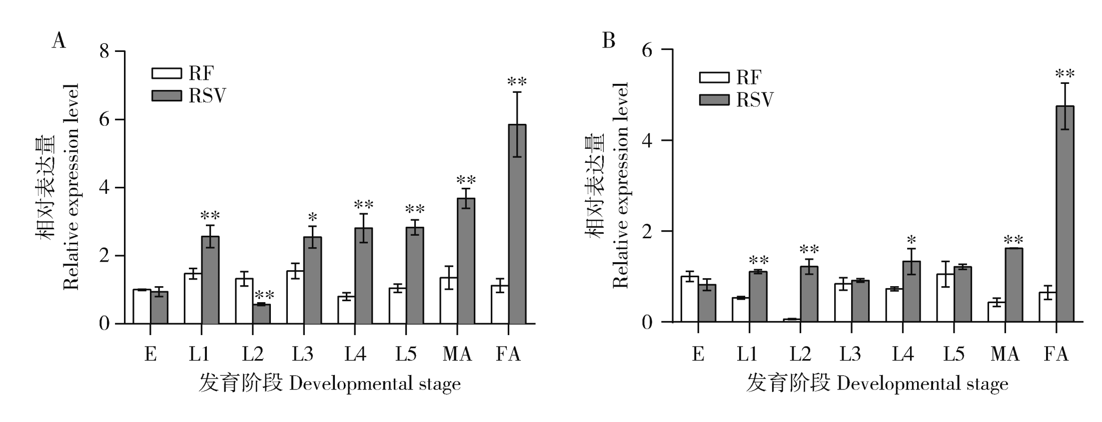


图 4　RSV 侵染后灰飞虱不同龄期 *IKKα*(A)和 *TBK*1(B)的相对表达水平

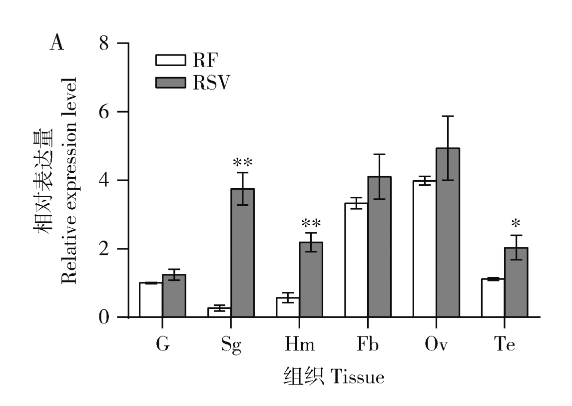
Fig. 4　Relative expression levels of *IKKα* (A) and *TBK*1 (B) in different developmental stages of *Laodelphax striatellus* in response to RSV infection

RSV: RSV 侵染 RSV-infected; RF: RSV 未侵染 RSV-free. E: 卵 Egg; L1 – 5: 分别为 1 – 5 龄若虫 1st – 5th instar nymph, respectively; MA: 雄成虫 Male adult; FA: 雌成虫 Female adult. 柱上单星号和双星号分别表示同一个基因相对表达量在 RF 与 RSV 间存在显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)差异(Student 氏 t 检验)。Single asterisk and double asterisk above bars indicate significant ($P<0.05$) and extremely significant ($P<0.01$) difference in the gene expression level between RF and RSV, respectively, by Student's t-test. 图 5 同 The same for Fig. 5.

(图 5: A)。*TBK*1 在无毒虫中仅在卵巢中高表达,而带毒虫中 *TBK*1 在唾液腺、脂肪体和卵巢相对于其他组织均为高表达。相对于无毒虫,RSV 侵染后,*TBK*1 在唾液腺和脂肪体中均极显著上调($P<0.01$)(图 5: B)。这些结果表明病毒侵染灰飞虱后期阶段 *IKKα* 和 *TBK*1 在昆虫的不同发育龄期及成虫不同组织中存在不同的响应模式。比较有意思的是,*TBK*1 仅在带毒虫血淋巴中较无毒虫出现了极显著下调($P<0.01$),同时病毒侵染并未对这两个基因在卵巢中的表达量产生显著影响($P>0.05$)(图 5: A, B)。

2.5 RNAi 干扰灰飞虱 *IKKα* 和 *TBK*1 对 RSV 侵染的影响

为进一步研究 *IKKα* 和 *TBK*1 在病毒侵染中的作用,利用 dsRNA 注射方法分别对带毒灰飞虱 3 龄若虫中的 *IKKα* 和 *TBK*1 进行干扰(ds*GFP* 作为对照)。实验结果表明,注射后 4 d 处理组灰飞虱中的 *IKKα* 和 *TBK*1 相对对照组(ds*GFP*)均极显著下调($P<0.01$),抑制率达到近 70%(图 6)。同时,qRT-PCR 检测对照及干扰相应基因后带毒灰飞虱中的 RSV 外壳蛋白的积累量(CP 基因的表达量),结果表明 *IKKα* 被干扰后的灰飞虱及 *TBK*1 被干扰后的灰飞虱体内 RSV CP 积累量比对照分别极显著上调了 6 倍和 2 倍($P<0.01$)(图 7),表明 *IKKα* 和 *TBK*1 在灰飞虱 NF-κB 抗病毒免疫信号通路的活化过程中很可能具有重要作用。



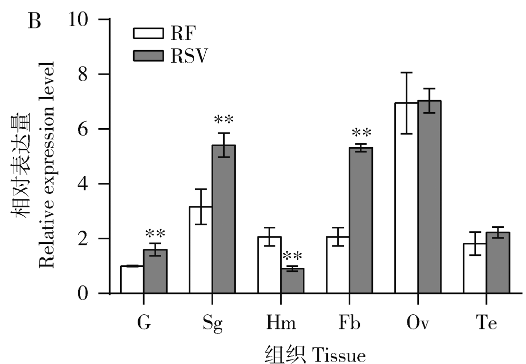
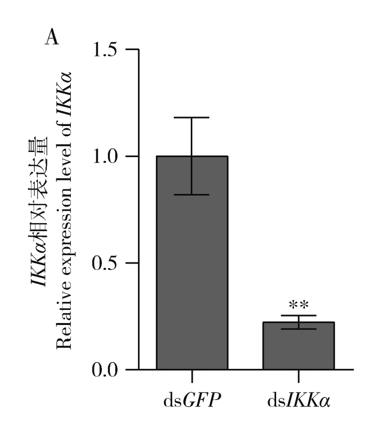


图 5 RSV 侵染后灰飞虱成虫不同组织中 *IKKα*(A)和 *TBK*1(B)的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression levels of *IKKα* (A) and *TBK*1 (B) in different adult tissues of *Laodelphax striatellus* in response to RSV infection

RSV: RSV 侵染 RSV-infected; RF: RSV 未侵染 RSV-free. G: 肠道 Gut; Sg: 唾液腺 Salivary gland; Hm: 血淋巴 Hemolympph; Fb: 脂肪体 Fat body; Ov: 卵巢 Ovary; Te: 精巢 Testis.



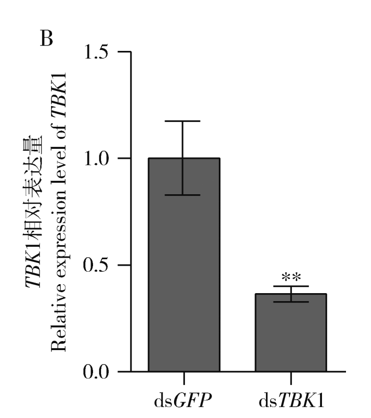


图 6 分别注射 *IKKα*(A)和 *TBK*1(B) dsRNA 后 4 d 带毒灰飞虱 3 龄若虫中靶基因的抑制效率

Fig. 6 RNA interference efficiency of target genes in the 3rd instar nymphs of RSV-infected *Laodelphax striatellus* post injection of *IKKα* (A) and *TBK*1 (B) dsRNA, respectively, for 4 d

Actin 为内参基因。柱上双星号表示与对照组(ds*GFP* 注射组)比较具有极显著差异($P<0.01$, Student 氏 t 检验)。*Actin* is used as an internal reference gene. Double asterisk above bars indicates extremely significant difference ($P<0.01$, Student's t-test) from the control group (ds*GFP* injection group). 图 7 同 The same for Fig. 7.

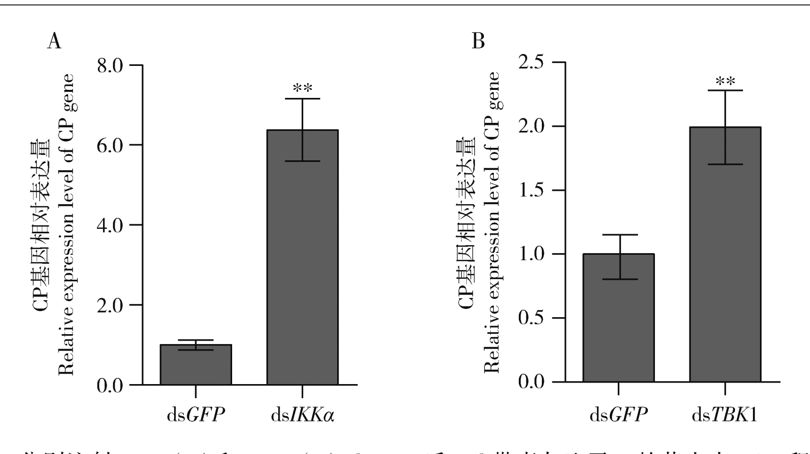


图 7　分别注射 *IKKα*（A）和 *TBK*1（B）dsRNA 后 4 d 带毒灰飞虱 3 龄若虫中 RSV 积累量

Fig. 7　Accumulation level of RSV in the 3rd instar nymphs of RSV-infected *Laodelphax striatellus* post injection of *IKKα* (A) and *TBK*1 (B) dsRNA, resepectively, for 4 d

RSV 积累量以 RSV 外壳蛋白（CP）基因的表达量表示。The accumulation level of RSV is expressed as the expression level of coat protein (CP) gene of RSV.

3　讨论

脊椎动物免疫系统可分为先天免疫及获得性免疫，在脊椎动物中，病毒、细菌、真菌等病原物入侵细胞，细胞中相关蛋白受体识别病原物并激活机体先天免疫系统抵御病原物的入侵（Janeway and Medzhitov, 1998）。目前一般认为无脊椎动物体内无获得性免疫，其抵御外源病原物入侵主要依赖先天免疫系统（Wang *et al*., 2014）。IKK 介导的 NF-κB 免疫信号通路的活化在无脊椎动物先天免疫中具有重要作用，NF-κB 信号通路调节失控和炎症、肿瘤、发育失调等多种病症有直接关系（Liu *et al*., 2012）。目前，IKK 及其相关基因在节肢动物中报道较少，在植物病毒传毒介体昆虫中还未见报道。

本研究从灰飞虱基因组中鉴定得到了两个 IKK 相关基因同源物，同源比对及系统进化分析表明这两个基因为 *IKKα* 和 *TBK*1。虽然我们利用模式昆虫中所有已知的 *IKK*（*IKKα*, *IKKβ* 及 *IKKγ*）及其相关基因（*IKKE* 和 *TBK*1）作为种子序列挖掘灰飞虱中的 *IKK*，但在灰飞虱中并未发现 *IKKβ*, *IKKγ* 及 *IKKE* 这 3 个基因。先前果蝇中的研究表明，果蝇的 IKK 复合物只包含 IKKβ 和 IKKγ，但没有 IKKα（Ferrandon *et al*., 2007）。类似地，最新的研究表明甲壳动物泥蟹 *Scylla paramamosain* 也只鉴定到了 IKKβ 和两种不同的剪切形式的 IKKE（Jiang *et al*., 2018）。因此灰飞虱中只鉴定到 *IKKα* 和 *TBK*1，可能是由于灰飞虱中确实不存在另外几种 IKK 相关基因。另外一种可能是由于目前灰飞虱的基因组还只是草图，序列信息还不够完善，还有部分基因未被充分挖掘。灰飞虱 *IKKα* 和 *TBK*1 均含有 1 个保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域和 1 个泛素折叠区域，同时两个基因在灰飞虱不同发育阶段和成虫的不同组织中均广泛表达，表明在进化过程中 *IKK* 及其相关基因的功能可能较保守。

NF-κB 信号通路主要由 Toll 和 IMD 两条通路组成，先前大量实验表明其能被病原菌（细菌、真菌和病毒）侵染所激活，并在昆虫体液免疫中具有重要作用（卢新民和叶恭银, 2006）。水疱性口炎病毒（vesicular stomatitis virus, VSV）侵染胚胎纤维细胞可顺利激活 IκB 激酶基因 *IKKβ* 的表达，进而诱导下游免疫反应，而 *IKKβ* 缺陷型细胞系则无法顺利激活 NF-κB 信号通路，表明 *IKKβ* 在免疫抗病毒中有重要作用（Chu *et al*., 1999）。后续研究表明，新发现的 IKK 相关基因 *IKKE* 和 *TBK*1 在病毒侵染后同样能激活 NF-κB 先天免疫反应，产生干扰素，抵御病毒入侵（Fitzgerald *et al*., 2003）。本研究结果表明，RSV 侵染灰飞虱后，*IKKα* 和 *TBK*1 在特定龄期及组织中被激活，两个基因均在带毒灰飞虱雌成虫中上调最明显（图 4），同时在成虫唾液腺、血淋巴、精巢（*IKKα*）或唾液腺、脂肪体（*TBK*1）等组织中显著上调（图 5），结合 RSV 在灰飞虱中的卵传特点及这些组织在植物病毒顺利入侵介体昆虫及循环复制中的重要作用（刘海建等, 2007），推测 *IKKα* 和 *TBK*1 可能和灰飞虱中 NF-κB 介导的先天免疫抗病毒通路相关。随后的 RNAi 干扰实验也表明 *IKKα* 和 *TBK*1 在 RSV 侵染灰飞虱过程中确实发挥了重要作用。

果蝇中的最新研究结果表明，果蝇 C 病毒

(Drosophila C virus, DCV)侵染干扰果蝇的 *IKKβ* 细胞系后,DCV 的丰度相对于对照显著上调,进一步的实验表明 *IKKβ* 对调控果蝇细胞系中依赖于 STING 和 NF-κB 的抗病毒免疫通路具有重要作用;但果蝇 IMD 通路中的 *IKKγ* 在 DCV 侵染时则无此调控作用(Goto *et al.*, 2018)。另外,对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和黄头病毒(yellow head disease, YHV)侵染斑节对虾 *Penaeus monodon*,对虾中的 *IKKE*1 和 *IKKE*2 在侵染后 6 和 24 h 相对对照显著上调,但 *IKKβ* 在两种病毒侵染后表达量则无显著改变(Nhnhkorn *et al.*, 2019)。这些研究结果表明同一物种中不同的 IKK 相关基因在应对病毒侵染过程中具有不同作用。因此,本研究 *IKKE* 和 *TBK*1 在病毒侵染后灰飞虱不同组织中呈现不同的表达模式,表明 NF-κB 免疫通路的 IKK 相关基因在抗病毒免疫反应中可能具有不同的功能,且可能具有组织特异性。本研究结果为深入研究介体昆虫中 NF-κB 免疫通路提供了丰富信息,同时也提出了很多需要进一步研究的问题。如病毒侵染灰飞虱不同阶段各个组织中 IKK 相关基因的表达模式,NF-κB 免疫通路下游相关基因对 RSV 的响应,最后是否产生抗菌肽,产生何种抗菌肽应对 RSV 的侵染等,这些问题的明确有助于我们进一步深入理解介体昆虫应对植物病毒的先天免疫机制。

参考文献(References)

Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, Graham K, Huang J, Ng M, Itié A, Wakeham A, Shahinian A, Henzel WJ, Elia AJ, Shillinglaw W, Mak TW, Cao ZD, Yeh WC, 2000. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-κB-dependent gene transcription. *EMBO J.*, 19(18): 4976–4985.

Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu YL, Williams B, Perrault J, Karin M, 1999. *JNK*2 and *IKKβ* are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, 11(6): 721–731.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M, 1997. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. *Nature*, 388(6642): 548–554.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA, 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 7(11): 862–874.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T, 2003. IKKε and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 4(5): 491–496.

Goto A, Okado K, Martins N, Cai H, Barbier V, Lamiable O, Troxler L, Santiag E, Kuhn L, Paik D, 2018. The kinase IKKβ regulates a STING- and NF-κB-dependent antiviral response pathway in *Drosophila*. *Immunity*, 49(2): 225–234.

Janeway CAJr, Medzhitov R, 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.*, 10(5): 349–350.

Jiang M, Tu DD, Gu WB, Zhou YL, Zhu QH, Guo XL, Shu MA, 2018. Identification and functional analysis of inhibitor of NF-κB kinase (IKK) from *Scylla paramamosain*: the first evidence of three IKKs in crab species and their expression profiles under biotic and abiotic stresses. *Dev. Comp. Immunol.*, 84: 199–212.

Karin M, Ben NY, 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-(kappa) B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 621–633.

Kim JY, Beg AA, Haura EB, 2013. Non-canonical IKKs, IKKε and TBK1, as novel therapeutic targets in the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 17(10): 1109–1112.

Kumar H, Kawai T, Akira S, 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.*, 30(1): 16–34.

Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM, 2012. IKK biology. *Immunol. Rev.*, 246(1): 239–253.

Liu HJ, Cheng ZB, Wang Y, Wei BQ, Ren CM, Zhou YJ, Fan YJ, 2007. Preliminary study on transmission of *Rice stripe virus* by small brown planthopper. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 23(5): 492–494. [刘海建, 程兆榜, 王跃, 魏邦庆, 任春梅, 周益军, 范永坚, 2007. 灰飞虱传递水稻条纹病毒研究初报. 江苏农业学报, 23(5): 492–494]

Liu XD, Zhai BP, Liu CM, 2006. Outbreak reasons of *Laodelphax striatellus* population. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(2): 141–146. [刘向东, 翟保平, 刘慈明, 2006. 灰飞虱种群暴发成灾原因剖析. 昆虫知识, 43(2): 141–146]

Lu XM, Ye GY, 2006. The NF-κB signaling pathway of insects. *Chin. J. Cell Biol. Sin.*, 28(4): 561–565. [卢新民, 叶恭银, 2006. 昆虫的 NF-κB 信号通路. 中国细胞生物学学报, 28(4): 561–565]

Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Jian WL, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A, 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IκB kinases essential for NF-κB activation. *Science*, 278(5339): 860–866.

Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M, Kimura H, Sakai K, Kato H, Takeda M, Kubota T, 2014. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of *IKKε* and *TBK*1 on type I IFN production. *PLoS ONE*, 9(4): e94999.

Nhnhkorn Z, Amparyup P, Kawai T, Tassanakajon A, 2019. *Penaeus monodon* IKKs participate in regulation of cytokine-like system and antiviral responses of innate immune system. *Front. Immunol.*, 10: 1430.

Pham AM, Tenoever BR, 2010. The IKK kinases: operators of antiviral signaling. *Viruses*, 2(1): 55–72.

Pu MH, 1963. A preliminary study on *Delphacodes striatella* Fallén. *Acta Entomol. Sin.*, 12(2): 117–136. [浦茂华, 1963. 苏南灰稻虱(*Delphacodes striatella* Fallén)的初步研究. 昆虫学报, 12(2):

117 – 136]

Rothwarf DM, Karin M, 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE*, 1999(5): RE1.

Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M, 1998. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the Ikappaβ kinase complex. *Nature*, 395(6699): 297 – 300.

Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M, 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature*, 404(6779): 778 – 782.

Tsai BH, Hwang FS, Feng WH, Fu YR, Dong QF, 1964. Study on *Delphacodes striatella* Fallén (Homoptera, Delphcidae) in North China. *Acta Entomol. Sin.*, 13(4): 552 – 571. [蔡邦华, 黄复生, 冯维熊, 傅亿荣, 董其芬, 1964. 华北稻区灰稻虱的研究. 昆虫学报, 13(4): 552 – 571]

Wang LF, Fu S, Xiao L, Chen C, Xue FS, 2013. Life history, reproduction and overwintering biology of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphcidae), in Nanchang, Jiangxi, East China. *Acta Entomol. Sin.*, 56(12): 1430 – 1439. [王柳风, 傅淑, 肖亮, 陈超, 薛芳森, 2013. 南昌地区灰飞虱的生活史、繁殖和越冬生物学特性. 昆虫学报, 56(12): 1430 – 1439]

Wang PH, Huang T, Zhang X, He JG, 2014. Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection. *Antivir. Res.*, 108: 129 – 141.

Zhao YW, 2016. Research progress of NF-κB signaling pathway. *Gansu Sci. Tech.*, 32(21): 117 – 123. [赵运旺, 2016. NF-κB 信号通路研究进展. 甘肃科技, 32(21): 117 – 123]

Zhu J, Jiang F, Wang X, Yang P, Bao Y, Zhao W, Wang W, Lu H, Wang Q, Cui N, Li J, Chen X, Luo L, Yu J, Kang L, Cui F, 2017. Genome sequence of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *GigaScience*, 6(12): 1 – 12.

（责任编辑：马丽萍）